



# **A Microbiota Intestinal nas Doenças Inflamatórias do Intestino e o Potencial Recurso a Probióticos e Prebióticos**

**Trabalho Final do Mestrado Integrado em Medicina**

Ana Rita Palmar Ribeiro

**Clínica Universitária de Pediatria**

Orientadora: Dra Ana Paula Mourato

Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa

2015-2016

## Índice

<b>Resumo .....</b>	<b>3</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>3</b>
<b>Introdução.....</b>	<b>4</b>
<b>Etiologia das DII.....</b>	<b>4</b>
<b>Microbiota.....</b>	<b>7</b>
<b>Microbiota nas Doenças Inflamatórias do Intestino .....</b>	<b>9</b>
<b>Probióticos, Prebióticos e Simbióticos .....</b>	<b>13</b>
<b>Probióticos e DII.....</b>	<b>14</b>
Colite Ulcerosa e Probióticos – Remissão .....	14
Colite Ulcerosa e Probióticos – Manutenção .....	16
Pouchite e Probióticos.....	17
Doença de Crohn e Probióticos – Remissão .....	17
Doença de Crohn e Probióticos – Manutenção .....	18
<b>Prebióticos e DII.....</b>	<b>18</b>
<b>Simbióticos e DII .....</b>	<b>19</b>
<b>Discussão .....</b>	<b>20</b>
<b>Agradecimentos .....</b>	<b>23</b>
<b>Bibliografia .....</b>	<b>24</b>

## Resumo

As doenças inflamatórias do intestino (DII) são doenças sistêmicas, imunomediadas, caracterizadas pela existência de uma inflamação crônica com alvo preferencial no trato gastrointestinal.

Apesar da sua etiologia ser desconhecida, vários fatores, genéticos e ambientais, têm sido alvo de estudo, verificando-se uma resposta inflamatória desapropriada e descontrolada à microbiota intestinal num hospedeiro com predisposição genética.

A implicação da microbiota intestinal na patogénese das DII impulsionou a sua investigação, possibilitando a sua manipulação no tratamento destes doentes. Deste modo, vários estudos têm-se focado na possibilidade de utilizar probióticos e prebióticos no tratamento destas doenças, tendo-se obtido resultados mais promissores com os probióticos *E. coli Nissle 1917* e VSL#3.

## Abstract

Inflammatory bowel disease (IBD) are systemic, immune-mediated disease, characterized by the existence of a chronic inflammation that have as a preferential target the gastrointestinal tract.

IBD results from an inappropriate and uncontrolled inflammatory response to the intestinal microbiota in a host with a genetic predisposition. Although the aetiology is unknown, several factors, genetic and environmental, have been the subject of study.

Although the aetiology is unknown, several factors, genetic and environmental, have been the subject of study, showing an inappropriate and uncontrolled inflammatory response to the intestinal microbiota in a host with a genetic predisposition.

The implication of the intestinal microbiota in the pathogenesis of IBD boosted its research, allowing its manipulation in the treatment of these patients. Thus, several studies have focused on the possibility of using probiotics and prebiotics to treat these diseases, yielding the most promising results with the probiotic *E. coli Nissle 1917* and VSL # 3.

## Introdução

As doenças inflamatórias do intestino (DII), que incluem Doença de Crohn (DC), Colite Ulcerosa (CU) e Colite Indeterminada (CI), são doenças sistêmicas, imunomediadas, caracterizadas pela existência de uma inflamação crônica que tem como alvo preferencial o trato gastrointestinal, envolvendo frequentemente outros órgãos e sistemas, com períodos ativos e outros de remissão. [1-4]

Num estudo realizado na Escócia, durante mais de 40 anos, foi recolhida *data* da incidência da Doença de Crohn na idade pediátrica, tendo-se concluído que houve um dramático aumento da mesma, com os últimos dados a apontar para uma incidência de 4,8 casos por 100,000 doentes/ano, não existindo, contudo, dados quanto à sua prevalência nesta população. Por outro lado, a incidência de Colite Ulcerosa em crianças tem permanecido estável. Estudos baseados em Wisconsin e Estocolmo reportam incidências de 2,1 e 2,4 casos por 100,000 doentes/ano, respetivamente. Estima-se que a prevalência da CU na idade pediátrica se encontre entre 18 e 30 por 100,000. Ainda que as DII sejam descritas em todo o mundo, algumas regiões são mais comumente referidas como tendo maior incidência, nomeadamente os Estados Unidos da América, o Reino Unido e os países Escandinavos. Por contraste, os países Africanos e Asiáticos são mencionados como apresentando uma menor incidência. [1-5]

O objetivo deste estudo centra-se no papel da alteração da microbiota na etiologia das DII e nas diferenças encontradas nesta em doentes com DII e na utilização de probióticos e prebióticos na sua modificação, como forma de tratamento destes doentes.

## Etiologia das DII

Apesar de esforços contínuos, a etiologia das DII permanece desconhecida. Contudo, acredita-se que resulta duma resposta inflamatória desapropriada e descontrolada da microbiota intestinal num hospedeiro com predisposição genética. Ainda que o *trigger* responsável pelo desenvolvimento destas doenças esteja por descobrir, está demonstrado a sua associação a fatores genéticos e ambientais. [6]

A existência de **fatores genéticos** tem sido sugerida desde há muito, baseada na prevalência da doença dentro das famílias, particularmente em relação a casos pediátricos de DII, em que 30% dos pacientes que apresentam DII antes dos 20 anos de idade têm história familiar de DII, em contraste com 14% dos que desenvolveram DII depois dos 40 anos. Estudos em gémeos, tiveram particular importância ao demonstrar a existência de predisposição genética nas DII, especialmente no caso da DC. Estes reportam, que ocorre concordância em 50% dos casos nos gémeos monozigóticos e menos de 10% nos dizigóticos. Estudos sobre as DII em gémeos e famílias revelaram que uma criança tem um risco 26 vezes superior de desenvolver DC quando um irmão já sofre da doença. [7, 8]

Desde a publicação do genoma humano, diversos *loci* foram identificados como responsáveis por provocar suscetibilidade à DII. O gene que codifica NOD2/CARD15 (*Caspase and Recruitment Domain*) foi o primeiro a ser identificado em 2001 e é o mais bem estudado. Este gene codifica uma proteína que atua como recetor intracelular para produtos bacterianos e transduz sinais que resultam na ativação de NFkB (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*), que por sua vez controla a transcrição de DNA e produção de citocinas pró-inflamatórias. A ativação do NOD2 com o dipéptido muramilo induz autofagia nas células dendríticas, tendo-se verificado que doentes com DC com variantes de NOD2 que conferem suscetibilidade para a doença, são deficientes na indução de autofagia. Ser portador homozigótico ou heterozigótico das variantes mais comuns de CARD15 tem sido associado a DC com *early onset* (doença surge entre os 6 e 18 anos), doença ileal e estenosante. [7-11]

Desde então já foram identificados diversos *loci* que conferem suscetibilidade às DII. Outros dois genes relacionados com o processo de autofagia, IRGM e ATG16L1, revelaram ter um papel importante na autofagia das respostas imunitárias nestas doenças. Os genes IL23R e PTPN2 também estão associados a doenças autoimunes e é sugerido que contribuam na patogénese da DC. As alterações genéticas identificadas que aumentam o risco de DC demonstram a importância do sistema imunitário, autofagia e fagocitose na patogénese da doença.[8-10]

Por outro lado, no grupo pediátrico, quando as DII são denominadas *infantile* (surge quando a criança tem menos de 1 ano de idade) e *very early onset* (surge quando a criança tem menos de 6 anos) não se tratam de verdadeiras DII, mas sim de inflamação intestinal *DII-like*, resultado de doenças monogénicas. As alterações

monogénicas encontradas afetam de diversas formas a homeostasia imunitária intestinal através disrupção da barreira epitelial e diminuição da eliminação de bactérias pelos neutrófilos e fagócitos. Também se encontraram alterações que resultam em hiperinflamação ou autoinflamação ou disrupção da seleção e ativação de linfócitos B e T. Por exemplo, mutações no gene IL10R conferem inflamação intestinal DII-like, estando os indivíduos afetados por mutações nesse gene associados a estados de imunodeficiência primária. É essencial para a homeostasia do cólon que a via de IL-10 se encontre funcional, dado que as alterações na citocina ou seu recetor causarem inflamação extensa no cólon e região perianal. [9, 10, 12, 13]

Ao longo dos anos, tem-se vindo também a estudar numerosos **fatores ambientais** que podem influenciar o desenvolvimento de DII, estando-lhes associados um efeito protetor ou de risco.[10]

Fumar é provavelmente o fator ambiental mais estudado nas DII. Enquanto que ser fumador ou ex-fumador é considerado sempre um fator de risco para o desenvolvimento da DC, alguns estudos alegam que ser ex-fumador aumenta o risco de CU, mas que ser fumador é um fator protetor para a CU. [10, 13]

A dieta tipicamente ocidentalizada, caracterizada por grande consumo de açúcares refinados e pobre em fibras, tem sido uma das possíveis explicações para o aumento de incidência das DII. [13]

Tem-se verificado que doentes com DII apresentam com frequência deficiência de vitamina D, porém não se sabe se tal será uma consequência da doença ou se a vitamina D terá um papel na modulação da função imunitária do intestino.[10, 13]

O estudo da influência do aleitamento materno nas DII tem apresentado resultados contraditórios, tendo sido alegado tanto que não influencia as DII, como que o aleitamento materno realizado durante mais de 1 ano seria um fator protetor para as DII.[13]

A utilização de alguns fármacos como contraceptivos orais, AINEs (anti-inflamatórios não esteróides) e antibióticos tem sido implicada no desenvolvimento de DII. O uso de contraceptivos orais e a sua utilização prolongada são considerados fatores de risco para o desenvolvimento de DC; o recurso a AINEs pelo menos 15 dias por mês

parece ser um fator de risco para DII e a exposição a antibióticos, pela sua capacidade de alterar a microbiota intestinal, também tem sido implicada. [10, 13]

Tal como noutras doenças que têm vindo a aumentar de incidência, a “hipótese de higiene” tem sido considerada um dos potenciais fatores de risco para estas doenças. Viver em áreas urbanizadas, coabitação com famílias menos numerosas, acesso a água potável, reduzidas infeções a helmintas, seriam fatores responsáveis por este aumento de incidência. [13]

Outros fatores ambientais que podem influenciar o aparecimento de DII incluem apendicectomia (fator protetor para CU e de risco para DC), infeções, poluição atmosférica, atividade física, vacinação e fatores psicológicos. [7, 10, 13]

## Microbiota

A **microbiota** compreende o conjunto de microrganismos comensais encontrados num organismo, que podem estabelecer relações simbióticas e patogénicas. As comunidades microbióticas que colonizam o intestino designam-se por microbiota intestinal.[14]

O intestino humano é hospedeiro de aproximadamente  $10^{14}$  bactérias, as quais podem perfazer até 1000 espécies. Quer isto dizer, que o número de bactérias no intestino humano é 10 vezes superior ao número total de células do corpo humano. Define-se por **microbioma** o conjunto da totalidade de micróbios e seus elementos genéticos, estimando-se que tenha 100 vezes mais genes do que os genes presentes no corpo humano. [15-17]

Mais de 99% da microbiota intestinal é composta por espécies que fazem parte de quatro filos bacterianas: *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria* e *Actinobacteria*. No intestino delgado proximal prevalecem espécies Gram-positivo e aeróbicas; enquanto que na porção distal predominam as espécies Gram-negativo. Distalmente à válvula ileocecal, a concentração de bactérias aumenta drasticamente, sendo o cólon a região do trato gastrointestinal mais densamente povoada por bactérias (maioritariamente *Bacteroides*, *Bifidobacteria*, *Fusobacteria*, *Clostridia* e *Peptostreptococci*).[15, 18-20]

É de realçar que as proporções da microbiota podem variar bastante entre indivíduos, podendo ocorrer mudanças significativas, tendo por base a idade do organismo hospedeiro (a microbiota intestinal entre o 1 e 2 anos de idade começa a assemelhar-se à do adulto, com redução de aeróbios e anaeróbios facultativos e aumento de anaeróbios obrigatórios), a dieta e estado de saúde. Fatores genéticos também têm um papel importante no desenvolvimento da microbiota intestinal, apesar do ambiente condicionar a aquisição de diferentes espécies. É de notar que enquanto a proporção e composição de *Bacteroidetes* parece ser estável num mesmo indivíduo, a de *Firmicutes* revela variações significativas.[21-24]

Estas bactérias que se encontram no lúmen intestinal estabelecem associações interativas a longo prazo com o hospedeiro, incluindo um papel crítico na conservação da função imunitária da mucosa (prepara o sistema imunitário da mucosa e mantém a homeostasia do epitélio intestinal), integridade epitelial de barreira (resistindo à colonização por micróbios exógenos com potencial patogénico), motilidade intestinal, absorção de nutrientes e metabolização de hidratos de carbono complexos e proteínas, com formação de produtos fermentados como ácidos gordos de cadeia curta. Deste modo, em condições normais, o hospedeiro e os micróbios comensais estabelecem uma relação simbiótica. Todavia, esta relação pode ser facilmente posta em risco por distúrbios ligeiros da microbiota normal (alterações qualitativas e quantitativas da microbiota e alterações da sua atividade metabólica), resultando isto em efeitos negativos para o hospedeiro. Esta situação é conhecida como **disbiose**, podendo levar à inflamação e lesão do tecido da mucosa, que parece predispor para situações como infeção por *Clostridium difficile*, doenças inflamatórias do intestino, cancro cólon-retal e síndrome do intestino irritável. Como já referido, simples fatores como antibióticos, stress, a dieta ocidental e higiene podem também contribuir para gerar disbiose.[17,24-26]



## Microbiota nas Doenças Inflamatórias do Intestino

O fato da microbiota ter um papel importante no desenvolvimento de DII é universalmente aceite. As DII têm tendência a ocorrer no cólon e íleo distal, que correspondem às áreas do intestino com maior concentração de bactérias. Para além disso, quando na prevenção e tratamento da DC se recorre a ileostomia e, consequentemente, se redireciona o material fecal, uma semana após se realizar a reinfusão da ileostomia ocorre reativação da inflamação. De forma semelhante, os doentes com CU que realizam cirurgia da bolsa íleo-anal, desenvolvem inflamação após colonização bacteriana da bolsa. O fato de estudos demonstrarem benefícios significativos quando se utilizam antibióticos na indução de remissão nas DII, superiores ao placebo, demonstra esta teoria. Estudos em animais têm sugerido que é necessário exposição e colonização bacteriana para que a doença ocorra: animais *genetically-engineered* em que foi desenvolvida colite espontânea em contexto laboratorial, mantinham-se livres de colite quando cresciam num ambiente estéril e modelos animais com colite medicamente induzida não desenvolveram inflamação intestinal quando tratados previamente com antibióticos.[27-35]

Atualmente é aceita que agentes microbianos fazem parte da patogénese das DII, de seguida apresentam-se quatro formas de como tal pode ocorrer:

### 1. Alteração da população da microbiota comensal

Estudos têm sugerido que as microbiotas fecal e da mucosa intestinal de doentes com DII são diferentes das encontradas em participantes controlo, acrescentado ainda que estas microbiotas são diferentes tanto na fase passiva como ativa da doença. Verificou-se em populações pediátricas com DII que ainda que a concentração bacteriana na mucosa intestinal seja mais elevada comparando à população em geral, existe perda de diversidade microbiana, especialmente à custa de anaeróbios. Para além disso, demonstrou-se diminuição da concentração de *Firmicutes*, especialmente à custa da classe Clostridia, e aumento de *Proteobacteria* e *Bacteroidetes*. É de realçar que se encontra frequentemente *Campylobacter* spp (que provoca inflamação intestinal DII-like) em biópsias do cólon em crianças, embora não esteja fortemente associado às DII. [36-49]

## **2. Indução de inflamação por patógenos microbianos**

Evidência que *Mycobacterium avium paratuberculosis* causa enterocolite granulosa no gado bovino resultou na conjectura de que também poderia estar implicado no desenvolvimento de DC. Contudo, estudos até ao momento não o comprovam. Continua por se esclarecer se seria necessário um único organismo específico ou um conjunto de agentes microbianos para que ocorresse o desenvolvimento de DII.[50, 51]

## **3. Disbiose da microbiota comensal com aumento de espécies agressivas para o hospedeiro**

*Adherent invasive E. coli* (AIEC) patogénicas colonizam frequentemente lesões ileais em doentes com DC. As AIEC provocam a libertação de citocinas pró-inflamatórias pelo hospedeiro, nomeadamente IL-1 $\beta$  e IL-6, provocando uma resposta inflamatória semelhante à evidenciada nas DII. Para além disto, verifica-se que doentes com DC apresentam sobreexpressão de CEACAM6, o qual atua como um recetor para as AIEC, facilitando que estas adiram, colonizem e atravessem a mucosa destes doentes. Desta forma as AIEC conseguem infetar os macrófagos da lamina própria e induzir a secreção de TNF- $\alpha$ , uma citocina pró-inflamatória importante na imunologia das DII.[52-56]

## **4. Resposta desapropriada à microbiota comensal**

### **a) Alteração da permeabilidade da mucosa**

A mucosa intestinal é formada por uma camada única de células unidas por *tight junctions* e consiste na primeira linha de defesa contra a invasão de agentes/bactérias patogénicas. Inflamação da mucosa intestinal provoca alterações nas *tight junctions*, fazendo com que a integridade desta barreira seja comprometida, o que resulta em aumento de permeabilidade, estando tal documentado em doentes com DII. Isto permite que bactérias penetrem nas células epiteliais e causem inflamação da mucosa.[57, 58]. São particularmente importantes nesta interacção, os Toll-like receptors (receptores major, envolvidos na discriminação do *self* e não-*self* no reconhecimento de padrões moleculares bacterianos), estando implicados na regulação da permeabilidade intestinal

e como adiante exposto, a sua sinalização é relevante no efeito anti-inflamatório dos probióticos.

### **b) Ineficácia da capacidade bactericida**

Tal como mencionado anteriormente no que concerne os fatores genéticos que condicionam a etiologia das DII, mutações no gene NOD2/CARD15 condicionam alterações na ativação de NFkB e diminuição da capacidade de autofagia das células dendríticas, essencial para a eliminação de patógenos. [7-11]

### **c) Imunorregulação deficiente**

Num hospedeiro normal, as bactérias comensais ativam respostas imunológicas nas células epiteliais, macrófagos, células dendríticas e linfócitos T e B, que permitem a coexistência do hospedeiro com micróbios e os seus produtos. Contudo nas DII, ocorre perda de tolerância às bactérias comensais, conduzindo a um processo de inflamação crónica em que a microbiota estimula constantemente o sistema imunitário do hospedeiro, perpetuando a doença. Isto pode resultar do sistema imunológico reconhecer a flora comensal como uma ameaça ou pela falha dos mecanismos que regulam a resposta imunitária da mucosa às bactérias intestinais. [18, 35, 59-61]

O sistema imunitário intestinal é composto por diversos tipos de células, nomeadamente células dendríticas, macrófagos, células *Natural Killers* (NK), células linfocíticas inatas e linfócitos intraepiteliais. No processo de tolerância imunológica ocorre reconhecimento da microbiota intestinal pelo sistema imunitário local, ativando a cascata inflamatória. Os linfócitos intraepiteliais, células Paneth e células M e os seus produtos formam uma barreira física e química, que nas DII se encontra alterada e não consegue impedir a invasão bacteriana. Na lamina própria, as células dendríticas capturam e reconhecem antígenos bacterianos, enquanto que nas placas de Peyer, as células dendríticas têm acesso aos antígenos através das células M. Posteriormente, as células dendríticas da lamina própria e placas de Peyer migram para os nódulos linfáticos mesentéricos e apresentam os antígenos para as células T naive (Th0).



Apesar haver avanços na compreensão da microbiota em doentes pediátricos com DII, alguns pontos fundamentais continuam por se entender, tais como, se é a microbiota intestinal a desencadear e manter a cronicidade da resposta inflamatória nas DII ou se é a sua alteração resultado da inflamação da mucosa ou se a permeabilidade intestinal descrita nestas doenças é um fenómeno primário ou secundário.

## Probióticos, Prebióticos e Simbióticos

O tratamento *standard* das DII inclui anti-inflamatórios (ácido 5-aminosalicilatos), imunomoduladores (esteróides, 6-mercaptopurina e azatioprina) e agentes biológicos (anticorpos anti-TNF). Tendo em conta o papel da microbiota na etiologia destas doenças, tem-se investigado como a sua manipulação através de probióticos, prebióticos e simbióticos pode vir a ser útil no tratamento destas doenças.

**Probióticos** são suplementos dietéticos de microrganismos vivos ou componentes de células microbianas que, quando ingeridos em quantidades suficientes, afetam o hospedeiro de forma benéfica direta ou indiretamente. Isto pode ser realizado através de diversas formas: [64-69]

1. Alguns probióticos, como *Lactobacilli* e *Bifidobacteria*, induzem a produção e secreção de diferentes substâncias com propriedades bactericidas. *Lactobacilli* produz ácido láctico, o que por sua vez diminui o pH luminal, inibindo o crescimento de bactérias Gram-negativas. O mesmo ocorre quando probióticos aumentam a produção de ácidos gordos de cadeia curta. [64-77]
2. Deslocar micróbios deletérios da interface lumén-mucosa ao competir pelos locais de ligação na superfície epitelial e camada mucosa, o que pode ser atingido através da  $\beta$ -defensina que certos probióticos promovem a produção. [64-77]
3. Modulação da imunidade da mucosa intestinal ao induzir o desenvolvimento de células T reguladoras e, conseqüentemente, da produção de citocinas anti-inflamatórias IL-10 e TGF- $\beta$ . [64-69]

4. Regulação da homeostasia do epitélio intestinal ao melhorar a função da barreira intestinal e reduzir a permeabilidade intestinal a microrganismos e outros antígenos, atuando sobre as *tight junctions*. [64-69]

Constatamos já, a influência que a sinalização TLR (*Toll-like receptors*) pode ter, no efeito anti-inflamatório dos probióticos, alcançada pela limitação da polarização das respostas Th1 ou Th2, mantendo a integridade da barreira intestinal.

Os **prebióticos** estimulam o crescimento e/ou atividade de um tipo ou de um número limitado de bactérias entéricas endógenas com caráter protetor. Apesar de se tratarem de hidratos de carbono não digeríveis, os prebióticos podem ser fermentados por bactérias no cólon e servir como substrato para o seu metabolismo. Para além disso, podem ser usados com o objetivo de aumentar/melhorar a sobrevivência e ação de probióticos.[65, 67]

Fala-se de **simbióticos** quando se combinam probióticos com prebióticos num único produto com o objetivo de obter efeitos sinérgicos. [65]

## Probióticos e DII

Nos últimos anos têm sido realizados vários estudos para avaliar a possível utilidade dos probióticos na Colite Ulcerosa e Doença de Crohn, quer na remissão como na manutenção da remissão da doença.

### Colite Ulcerosa e Probióticos – Remissão

Existem dados contraditórios acerca da futura utilidade de probióticos na remissão da CU, dependendo do probiótico utilizado.

De todos os probióticos que têm sido estudados aquele que apresentou até agora resultados mais promissores é o VSL#3, que contém quatro estirpes de *Lactobacilli* (*L. casei*, *L. plantarum*, *L. acidophilus* e *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*), três de *Bifidobacteria* (*B. longum*, *B. breve* e *B. infantis*) e uma de *Streptococcus* (*S. salivarius* subsp. *thermophilus*).[78]

O VSL#3 revelou-se eficaz e seguro na indução de remissão da CU ligeira a moderada em múltiplos estudos, bem como boa tolerância, não tendo sido reportados efeitos adversos bioquímicos ou clínicos significativos. Estas conclusões também foram corroboradas em estudos de populações pediátricas, que revelaram ainda a eficácia deste probiótico na manutenção da remissão da doença nesta faixa etária. A administração de VSL#3 duas vezes por dia numa dose de  $3.6 \times 10^9$  CFU resultou na diminuição significativa da atividade da doença (UCDAI). [79-82]

Foram realizados também alguns estudos que avaliaram a eficácia do VSL#3 na remissão de CU associado a terapêutica médica *standard*. Foi demonstrado que a administração concomitante de balsalazide e de VSL#3 é significativamente superior e mais rápida a obter a remissão da doença do que a administração isolada de uma dose média de balsalazide e messalazina isoladas em doentes com CU ligeira e moderada. Outro estudo revelou remissão ligeiramente superior em doentes a efetuar tratamento com VSL#3 e aminosalicilatos e/ou imunossuppressores concomitantemente, comparando com doentes que o não receberam. [78, 83]

Outro probiótico estudado tem sido o “*Bifidobacteria-fermented milk*”, BFM, que contém *Bifidobacterium breve* estirpe Yakult, *B. bifidum* e *Lactobacillus acidophilus*. Um estudo concluiu que a utilização de BFM como suplemento dietético é mais efetivo que o tratamento convencional de CU, estando associada a redução da atividade da doença, melhoria endoscópica e histológica. Para além disso, verifica-se com a utilização de BFM diminuição da taxa de exacerbações cumulativas e aumento de butirato fecal, proprionato e ácidos gordos de cadeia curta. É importante ter em conta que o butirato atua como um nutriente para as células do cólon e promove a reparação do epitélio intestinal nas DII. Além disso, existe evidência que atua diretamente como um agente anti-inflamatório ao desativar a via NFκB, com a consequente diminuição da síntese de citocinas inflamatórias. [70, 72, 73, 75, 84, 85]

Segundo estudos realizados que incidiram sobre *E. coli Nissle 1917*, acredita-se que o probiótico tenha um efeito equivalente ao da messalazina na obtenção de remissão e manutenção de remissão na CU. Não se verificaram diferenças significativas na obtenção, duração média e tempo médio para atingir remissão, e no número de doentes que sofreram recaídas comparando os doentes que efetuaram o probiótico e os que tomaram messalazina., tendo o mesmo sido demonstrado num estudo realizado numa população pediátrica. [86, 87]

O recurso a enema de *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 numa população pediátrica com CU distal ativa revelou melhoria significativa tanto clínica como endoscópica e histológica. Para além disso, a avaliação da expressão de citocinas da mucosa revelou aumento dos níveis de IL-10, citocina imunossupressora, e diminuição de IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  e IL-8, citocinas pró-inflamatórias. [88]

A utilização de *Saccharomyces boulardii* no tratamento de exacerbação de CU ligeira a moderada em doentes que se encontravam a efetuar tratamento de manutenção com messalazina resultou em remissão clínica e endoscópica. [89]

BIO-THREE (contém *Streptococcus faecalis*, *Clostridium butyricum* e *Bacillus mesentericus*) é outro probiótico que também foi alvo de estudo, contudo, este não apresentou resultados promissores. [90]

Tendo em conta as várias meta-análises e estudos clínicos realizados nos últimos anos, a adição de probióticos específicos à terapêutica convencional na CU ativa pode ser benéfica, sendo que existe mais evidência na utilização de VSL#3.

### **Colite Ulcerosa e Probióticos – Manutenção**

A *E. coli Nissle 1917* é um probiótico que pode ser utilizado no tratamento de remissão e de manutenção de remissão da CU de forma eficaz e segura, parecendo ter efeitos equivalentes à utilização de messalazina. [86, 91, 92]

Aparentemente o tratamento com *Lactobacillus rhamnosus* GG de forma isolada ou combinado com messalazina apresenta maior efetividade do que o tratamento *standard* com messalazina, mais especificamente na sua capacidade de prolongar o intervalo entre recaídas. [93]

Também é sugerido que o VSL#3 é útil na manutenção de remissão de CU, incluindo doentes pediátricos. [82, 94]

A administração de uma cápsula com bífidos triplos (BIFICO) mostrou-se efetiva na prevenção de exacerbações de CU crónica. Para além disso, verificou-se que há aumento significativo da concentração fecal de *Lactobacilli* e *Bifidobacteria*, diminuição da expressão do pró-inflamatório NF $\kappa$ B p65 e aumento de RNAm de citocinas anti-inflamatórias. [95]



Foram também realizados estudos para avaliar a utilidade de *Lactobacillus salivarius* subspécies *salivarius* UCC118, *Bifidobacterium infantis* 35624 e do preparado probiótico Probio-Tec-AB-25 (que contém *Lactobacillus acidophilus* La-5 e *Bifidobacterium animalis* subespécie *lactis* BB-12), que revelaram a ausência de benefício clínico comparativamente ao placebo. [96]

Das várias meta-análises que se têm realizado nos últimos anos, o consenso geral é de que *Escherichia coli* Nissle 1917 e VSL#3 são, provavelmente, tão eficazes como a terapêutica de manutenção *standard* com messalazina e, por isso, podem substituí-la em pacientes que sejam intolerantes ou alérgicos a 5-aminisalicilatos, ou mesmo impossibilitados de os tomar dado os potenciais efeitos adversos destes como a nefrite intestinal, ou ainda como terapêutica adjuvante à terapêutica *standard*, com o objetivo de prolongar o tempo de remissão.

### **Pouchite e Probióticos**

A pouchite ocorre quando se dá inflamação do neo-recto, na sequência de proctocolectomia total, a qual é realizada com frequência na CU. Estudos que se debroçaram sobre a utilização do probiótico VSL#3 demonstraram que este é efetivo na prevenção primária e secundária de pouchite, estando-lhe associado melhoria clínica, endoscópica e histológica.[97-105]

Também foram conduzidos estudos que se questionavam sobre a possível utilização de *Lactobacillus rhamnosus* GG, mas estes não demonstraram superioridade ao placebo. [106-108]

### **Doença de Crohn e Probióticos – Remissão**

Poucos têm sido os probióticos estudados no tratamento da Doença de Crohn. *Lactobacillus rhamnosus* GG é um dos poucos estudados e mesmo assim apresentou resultados contraditórios. Enquanto que um estudo sugeriu melhora clínica e da função de barreira intestinal/permeabilidade intestinal em crianças com DC ligeira a moderada, outro não revelou quaisquer benefícios na remissão ou manutenção da remissão medicamente induzida na DC. [109, 110]

## Doença de Crohn e Probióticos – Manutenção

Até agora foram realizados poucos estudos de boa qualidade focados na eficácia dos probióticos na manutenção da remissão da doença da DC, a qual poderá ter sido atingida através de terapêutica médica *standard* ou cirúrgica.

Foi sugerida a possível utilidade de *Saccharomyces boulardii* associada a messalazina na manutenção de remissão em doentes com DC, tendo sido esta combinação associada a um menor número de recaídas comparativamente aos doentes que recebiam apenas messalazina. Todavia, esta diferença não é estatisticamente significativa. [111]

*Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) e *Lactobacillus johnsonii* LA1 também foram alvo de interesse, contudo, estudos demonstraram a inefetividade ou ineficácia destes probióticos na manutenção de remissão de DC. [112-115]

Atualmente, os probióticos não são recomendados na manutenção da remissão da Doença de Crohn, sendo considerado que não são superiores ao placebo e que a administração de LGG até pode aumentar a taxa de recidivas.

## Prebióticos e DII

Comparativamente com os probióticos, existe muito menos evidência clínica de que os prebióticos sejam úteis no tratamento de Doenças Inflamatórias do Intestino. Assim sendo, nos próximos parágrafos refiro algumas das conclusões a que se chegou até ao momento.

O prebiótico *Psyllium* (*Plantago* ovata, casca de ispaghula) demonstrou ser eficaz no alívio de sintomas gastrointestinais em doentes com CU em remissão. [116]

Conjetura-se que as sementes de *Plantago* ovata talvez sejam tão eficazes como a mesalamina no tratamento de manutenção nos doentes com CU em remissão. Sendo de notar ainda que doentes que receberam o prebiótico apresentaram um aumento significativo de butirato fecal. [117]

Verificou-se em doentes com CU ativa ligeira ou moderada que receberam oligofrutose enriquecida com inulina que, independentemente de estarem ou não a fazer

tratamento concomitante com messalazina, ocorria redução significativa da calprotectina fecal, um marcador de inflamação intestinal. [118]

Constatou-se que *Germinated Barley Foodstuff* (GBF), que consiste em fibra dietética e proteínas enriquecidas em glutamina, reduz a atividade clínica de CU ativa e parece ser eficaz no tratamento de manutenção dos doentes com CU. [119, 120]

O prebiótico FOS tem tido resultados contraditórios. Num estudo em doentes com DC revelou redução da atividade da doença de forma significativa e noutro não revelou diferenças significativas comparativamente ao placebo. [121, 122]

A lactulose é outro prebiótico que foi alvo de estudo, contudo parece não ser mais eficaz que o placebo em relação a melhoria clínica, endoscópica ou imunohistoquímica, tanto em doentes com CU como em doentes com DC. [123]

Perante o exposto, torna-se claro que existe pouca evidência na utilidade dos prebióticos nas DII. Contudo, é possível que o GBF, *Psyllium* e inulina enriquecida em oligofructose possam ser úteis em pacientes com CU ativa ou em remissão, sendo necessários mais estudos para o comprovar.

## Simbióticos e DII

Tal como foi referido para os prebióticos, também poucos têm sido os estudos realizados visando obter informações sobre a possível utilidade dos simbióticos nas DII.

Um dos estudos com simbióticos foi realizado em doentes com CU combinando o probiótico *Bifidobacterium longum* e um prebiótico, um substrato de crescimento inulina-frutose (Synergy 1). As biópsias, obtidas em sigmoidoscopias realizadas ao fim de um mês da administração do simbiótico, revelaram diminuição de inflamação e aumento da regeneração do tecido epitelial, bem como diminuição significativa dos níveis de RNAm de beta defensinas 2,3 e 4 (muito elevadas na CU ativa), TNF- $\alpha$  IL-1 $\alpha$ . [124]

Um simbiótico que combinava *Bifidobacterium breve* estirpe Yakurt e GOS também foi estudado em doentes com CU ativa, tendo-se verificado, um ano após a sua administração, diminuição dos níveis de mieloperoxidase (um marcador de inflamação), de *Bacteroidaceae* e do pH fecal. [125]

Passando a falar de simbióticos que foram estudados em doentes com DC, um deles incluía *Bifidobacterium breve*, *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium longum* e *Plantago ovata*, e verificou-se que a combinação em altas doses desses probióticos e prebióticos pode ser utilizada em co-terapia em doentes com DC ativa refratária a aminosalicilatos e prednisolona. [126]

Demonstrou-se que um simbiótico que combinava *Bifidobacterium longum* e Synergy 1 conduzia a significativas melhoras clínicas e histológicas em doentes com DC que efetuavam concomitantemente terapêutica convencional. Para além disso, verificou-se ainda redução significativa do pró-inflamatório TNF- $\alpha$  e um aumento de *Bifidobacteria* na mucosa. [127]

Estes estudos demonstram que existe um enorme potencial para a utilização de simbióticos no tratamento de DII, apesar de ser necessário a realização de mais estudos de qualidade.

## Discussão

Apesar da etiologia das DII permanecer desconhecida, tudo leva a crer que resulta da desregulação do sistema imunitário inato e adaptativo contra as bactérias e seus produtos no lúmen intestinal, em hospedeiro geneticamente suscetível de as desenvolver. [6, 128, 129]

A existência de variantes de genes e *loci* que provocam suscetibilidade às DII, como o NOD2, e fatores ambientais (ser fumador, a dieta ocidental e certos fármacos), estes últimos possivelmente por mecanismos epigenéticos e por alterações que podem causar na microbiota intestinal, têm-se revelado importantes na compreensão destas doenças. [10]

Existe evidência em modelos animais e *in vitro* de que a microbiota intestinal modula a resposta imunitária e promove tolerância, o que quer dizer que a sua disrupção pode resultar não só no desenvolvimento de DII, mas também em outras doenças imuno-mediadas. [130]

A elevada concentração de bactérias no íleo distal e cólon faz suspeitar que entre estas se encontrem patógenos responsáveis pela iniciação de DII, sem nunca ter sido

possível isolar um agente ou um conjunto deles como tendo uma relação consistente com as DII. É de realçar que devido ao elevado número de bactérias anaeróbias na flora intestinal, qualquer perturbação do epitélio intestinal pode resultar numa resposta inflamatória. Isto pode ter como causa a presença de produtos microbianos que alteram o epitélio ou de defeitos no próprio epitélio que permitam que bactérias e antigénios estimulem o sistema imunitário da mucosa.[131, 132]

A importância da microbiota na indução e/ou manutenção das DII tem sido repetidamente demonstrado em modelos animais, tendo-se verificado em ratinhos que a presença de bactérias é imprescindível para o desenvolvimento de DII. Para além disso, existe evidência que a microbiota intestinal se apresenta alterada nestes doentes. Na população pediátrica com DII, evidenciou-se a existência de menor diversidade bacteriana associada a um maior número de anaeróbios, assim como alterações na concentração de *Firmicutes*, *Protobacteria* e *Bacteroidetes* comparativamente com grupos controlo e a presença frequente de *Campylobacter* em biópsias intestinais. [33, 36, 46, 48, 49, 96, 133, 134]

Deste modo, têm sido realizados estudos que avaliam as interações entre micróbios intestinais e hospedeiro, sendo que parte dos estudos envolvem a manipulação da microbiota intestinal, o que pode ser feito recorrendo a antibióticos, probióticos, prebióticos e transplante fecal. Os efeitos dos prebióticos e probióticos são provavelmente influenciados por variáveis do hospedeiro (predisposição genética para doenças inflamatórias do intestino e polimorfismos específicos no reconhecimento de microrganismos que influenciam a suscetibilidade de colonização do intestino) e ambiente (microbiota materna, alimentação, antibióticos e outras influências imunomodulatórias que podem ter efeitos secundários na colonização intestinal). [135]

Os efeitos benéficos que os probióticos e prebióticos podem ter nas DII podem ser atingidos de diversas formas, como por exemplo: produção de substâncias bactericidas, impedimento da adesão de patógenos à mucosa intestinal, imunomodelação e regulação da homeostasia intestinal. [136-138]

Atualmente, nenhum probiótico ou prebiótico é recomendado na indução ou manutenção de remissão da CU ou DC, dado a evidência recolhida até à data ser insuficiente, expeto no que concerne a pouchite, em que existe evidência da efetividade da utilização do probiótico VSL#3 na prevenção primária e secundária da mesma. Para

além disso, o probiótico *E. coli Nissle 1917* que apresentou resultados positivos na manutenção de remissão na CU, podendo vir a ser considerado uma alternativa em pacientes intolerantes ou alérgicos ao tratamento com aminosalicilatos. Também o VSL#3 aparenta ser eficaz como adjuvante no tratamento da CU ativa. Ainda que esteja por comprovar a utilidade de algum destes produtos na DC, um simbiótico que combina *B. longum* e Sinergy 1 parece ser eficaz na indução de remissão da DC. [78-83, 86, 87, 91, 105, 126]

Apesar do número crescente de estudos a incidir sobre a utilidade de probióticos, prebióticos e simbióticos nas DII, estes apresentam diversas limitações, como por exemplo a dimensão da amostra, duração dos estudos, características específicas dos participantes (por exemplo quanto à localização da doença) e desconhecimento do perfil de segurança destes substratos. Outra limitação importante é a dificuldade de comparar os estudos entre si, devido à qualidade dos mesmos e significativa heterogeneidade no que concerne às preparações, populações estudadas e *outcomes* avaliados. [139]

Conclui-se, então, que apesar de ainda não se recomendar a utilização de probióticos e prebióticos, é evidente que estes poderão vir a assumir um papel importante no tratamento das DII, nomeadamente na prevenção da pouchite e como adjuvante à terapêutica convencional, especialmente em doentes que não respondam a essa terapêutica ou aos que lhe sejam intolerantes. Deste modo, faz sentido continuar a investir em mais estudos de alta qualidade e focados numa maior diversidade de probióticos e prebióticos, bem como nas suas variadas combinações.

## Agradecimentos

Esta tese não poderia ter sido elaborada sem a orientação, colaboração e disponibilidade manifestadas pela Dr<sup>a</sup> Ana Paula Mourato que se prontificou ser minha orientadora e que ao longo de meses de escrita acompanhou, corrigiu e sugeriu melhorias na sua produção.

Apraz-me, igualmente, sublinhar o contributo dado pela Dr<sup>a</sup> Isabel Esteves na indicação da Dr<sup>a</sup> Ana Paula Mourato como a pessoa certa para a orientação da minha tese.

Não poderia deixar de manifestar a minha gratidão à Professora Doutora Maria do Céu Machado por ter aceitado o pedido de elaboração desta tese na Clínica Universitária de Pediatria do Hospital de Sta. Maria

À minha família e amigos, cujo apoio constante não me faltou ao longo desta jornada, quero manifestar o meu mais sincero agradecimento.

## Bibliografia

1. Fernandes, A., S. Bacalhau, and J. Cabral, *[Pediatric inflammatory bowel disease: is it still increasing?]*. Acta Med Port, 2011. **24 Suppl 2**: p. 333-8.
2. Hendrickson, B.A., R. Gokhale, and J.H. Cho, *Clinical aspects and pathophysiology of inflammatory bowel disease*. Clin Microbiol Rev, 2002. **15**(1): p. 79-94.
3. Russell, R.K., et al., *Analysis of the influence of OCTN1/2 variants within the IBD5 locus on disease susceptibility and growth indices in early onset inflammatory bowel disease*. Gut, 2006. **55**(8): p. 1114-23.
4. Tsang, J., et al., *Histopathological changes in anatomical distribution of inflammatory bowel disease in children: a retrospective cohort study*. BMC Pediatr, 2012. **12**: p. 162.
5. Ye, Y., et al., *The epidemiology and risk factors of inflammatory bowel disease*. Int J Clin Exp Med, 2015. **8**(12): p. 22529-42.
6. Dinwiddie, D.L., et al., *Molecular diagnosis of infantile onset inflammatory bowel disease by exome sequencing*. Genomics, 2013. **102**(5-6): p. 442-7.
7. Beattie, R.M., et al., *Inflammatory bowel disease*. Arch Dis Child, 2006. **91**(5): p. 426-32.
8. Loddo, I. and C. Romano, *Inflammatory Bowel Disease: Genetics, Epigenetics, and Pathogenesis*. Front Immunol, 2015. **6**: p. 551.
9. Ek, W.E., M. D'Amato, and J. Halfvarson, *The history of genetics in inflammatory bowel disease*. Ann Gastroenterol, 2014. **27**(4): p. 294-303.
10. Zhang, Y.Z. and Y.Y. Li, *Inflammatory bowel disease: pathogenesis*. World J Gastroenterol, 2014. **20**(1): p. 91-9.
11. Knights, D., K.G. Lassen, and R.J. Xavier, *Advances in inflammatory bowel disease pathogenesis: linking host genetics and the microbiome*. Gut, 2013. **62**(10): p. 1505-10.
12. Okou, D.T. and S. Kugathasan, *Role of genetics in pediatric inflammatory bowel disease*. Inflamm Bowel Dis, 2014. **20**(10): p. 1878-84.
13. Dutta, A.K. and A. Chacko, *Influence of environmental factors on the onset and course of inflammatory bowel disease*. World J Gastroenterol, 2016. **22**(3): p. 1088-100.
14. Han, H., et al., *Impact of 4-epi-oxytetracycline on the gut microbiota and blood metabolomics of Wistar rats*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 23141.
15. Jager, S., E.F. Stange, and J. Wehkamp, *Inflammatory bowel disease: an impaired barrier disease*. Langenbecks Arch Surg, 2013. **398**(1): p. 1-12.
16. Stephani, J., K. Radulovic, and J.H. Niess, *Gut microbiota, probiotics and inflammatory bowel disease*. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2011. **59**(3): p. 161-77.
17. Cash, H.L., et al., *Symbiotic bacteria direct expression of an intestinal bactericidal lectin*. Science, 2006. **313**(5790): p. 1126-30.
18. Sartor, R.B., *Microbial influences in inflammatory bowel diseases*. Gastroenterology, 2008. **134**(2): p. 577-94.
19. Eckburg, P.B., et al., *Diversity of the human intestinal microbial flora*. Science, 2005. **308**(5728): p. 1635-8.
20. Kanauchi, O., et al., *The beneficial effects of microflora, especially obligate anaerobes, and their products on the colonic environment in inflammatory bowel disease*. Curr Pharm Des, 2005. **11**(8): p. 1047-53.
21. Hopkins, M.J., et al., *Characterisation of intestinal bacteria in infant stools using real-time PCR and northern hybridisation analyses*. FEMS Microbiol Ecol, 2005. **54**(1): p. 77-85.
22. Palmer, C., et al., *Development of the human infant intestinal microbiota*. PLoS Biol, 2007. **5**(7): p. e177.



23. Zoetendal, E.G., M. Rajilic-Stojanovic, and W.M. de Vos, *High-throughput diversity and functionality analysis of the gastrointestinal tract microbiota*. Gut, 2008. **57**(11): p. 1605-15.
24. Bien, J., V. Palagani, and P. Bozko, *The intestinal microbiota dysbiosis and Clostridium difficile infection: is there a relationship with inflammatory bowel disease?* Therap Adv Gastroenterol, 2013. **6**(1): p. 53-68.
25. Bernstein, C.N. and F. Shanahan, *Disorders of a modern lifestyle: reconciling the epidemiology of inflammatory bowel diseases*. Gut, 2008. **57**(9): p. 1185-91.
26. Falony, G., et al., *Cross-feeding between Bifidobacterium longum BB536 and acetate-converting, butyrate-producing colon bacteria during growth on oligofructose*. Appl Environ Microbiol, 2006. **72**(12): p. 7835-41.
27. D'Haens, G.R., et al., *Early lesions of recurrent Crohn's disease caused by infusion of intestinal contents in excluded ileum*. Gastroenterology, 1998. **114**(2): p. 262-7.
28. Harper, P.H., et al., *Role of the faecal stream in the maintenance of Crohn's colitis*. Gut, 1985. **26**(3): p. 279-84.
29. de Silva, H.J., et al., *Effects of the faecal stream and stasis on the ileal pouch mucosa*. Gut, 1991. **32**(10): p. 1166-9.
30. Khan, K.J., et al., *Antibiotic therapy in inflammatory bowel disease: a systematic review and meta-analysis*. Am J Gastroenterol, 2011. **106**(4): p. 661-73.
31. Guslandi, M., *Antibiotics for inflammatory bowel disease: do they work?* Eur J Gastroenterol Hepatol, 2005. **17**(2): p. 145-7.
32. Sellon, R.K., et al., *Resident enteric bacteria are necessary for development of spontaneous colitis and immune system activation in interleukin-10-deficient mice*. Infect Immun, 1998. **66**(11): p. 5224-31.
33. Taurog, J.D., et al., *The germfree state prevents development of gut and joint inflammatory disease in HLA-B27 transgenic rats*. J Exp Med, 1994. **180**(6): p. 2359-64.
34. Kishi, D., et al., *Alteration of V beta usage and cytokine production of CD4+ TCR beta beta homodimer T cells by elimination of Bacteroides vulgatus prevents colitis in TCR alpha-chain-deficient mice*. J Immunol, 2000. **165**(10): p. 5891-9.
35. Fiorucci, S., et al., *Inhibition of intestinal bacterial translocation with rifaximin modulates lamina propria monocytic cells reactivity and protects against inflammation in a rodent model of colitis*. Digestion, 2002. **66**(4): p. 246-56.
36. Conte, M.P., et al., *Gut-associated bacterial microbiota in paediatric patients with inflammatory bowel disease*. Gut, 2006. **55**(12): p. 1760-7.
37. Sokol, H., et al., *Specificities of the fecal microbiota in inflammatory bowel disease*. Inflamm Bowel Dis, 2006. **12**(2): p. 106-11.
38. Takaishi, H., et al., *Imbalance in intestinal microflora constitution could be involved in the pathogenesis of inflammatory bowel disease*. Int J Med Microbiol, 2008. **298**(5-6): p. 463-72.
39. Swidsinski, A., et al., *Mucosal flora in inflammatory bowel disease*. Gastroenterology, 2002. **122**(1): p. 44-54.
40. Swidsinski, A., et al., *Active Crohn's disease and ulcerative colitis can be specifically diagnosed and monitored based on the biostructure of the fecal flora*. Inflamm Bowel Dis, 2008. **14**(2): p. 147-61.
41. Frank, D.N., et al., *Disease phenotype and genotype are associated with shifts in intestinal-associated microbiota in inflammatory bowel diseases*. Inflamm Bowel Dis, 2011. **17**(1): p. 179-84.
42. Walker, A.W., et al., *High-throughput clone library analysis of the mucosa-associated microbiota reveals dysbiosis and differences between inflamed and non-inflamed regions of the intestine in inflammatory bowel disease*. BMC Microbiol, 2011. **11**: p. 7.
43. Sepehri, S., et al., *Microbial diversity of inflamed and noninflamed gut biopsy tissues in inflammatory bowel disease*. Inflamm Bowel Dis, 2007. **13**(6): p. 675-83.

44. Kleessen, B., et al., *Mucosal and invading bacteria in patients with inflammatory bowel disease compared with controls*. Scand J Gastroenterol, 2002. **37**(9): p. 1034-41.
45. Ott, S.J., et al., *Reduction in diversity of the colonic mucosa associated bacterial microflora in patients with active inflammatory bowel disease*. Gut, 2004. **53**(5): p. 685-93.
46. Kaakoush, N.O., et al., *Microbial dysbiosis in pediatric patients with Crohn's disease*. J Clin Microbiol, 2012. **50**(10): p. 3258-66.
47. Kellermayer, R., et al., *Microbiota separation and C-reactive protein elevation in treatment-naïve pediatric granulomatous Crohn disease*. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2012. **55**(3): p. 243-50.
48. Hansen, R., et al., *Microbiota of de-novo pediatric IBD: increased Faecalibacterium prausnitzii and reduced bacterial diversity in Crohn's but not in ulcerative colitis*. Am J Gastroenterol, 2012. **107**(12): p. 1913-22.
49. Hansen, R., et al., *The microaerophilic microbiota of de-novo paediatric inflammatory bowel disease: the BISCUIT study*. PLoS One, 2013. **8**(3): p. e58825.
50. Chiodini, R.J., *Crohn's disease and the mycobacterioses: a review and comparison of two disease entities*. Clin Microbiol Rev, 1989. **2**(1): p. 90-117.
51. Selby, W., et al., *Two-year combination antibiotic therapy with clarithromycin, rifabutin, and clofazimine for Crohn's disease*. Gastroenterology, 2007. **132**(7): p. 2313-9.
52. Darfeuille-Michaud, A., et al., *Presence of adherent Escherichia coli strains in ileal mucosa of patients with Crohn's disease*. Gastroenterology, 1998. **115**(6): p. 1405-13.
53. Baumgart, M., et al., *Culture independent analysis of ileal mucosa reveals a selective increase in invasive Escherichia coli of novel phylogeny relative to depletion of Clostridiales in Crohn's disease involving the ileum*. ISME J, 2007. **1**(5): p. 403-18.
54. Carvalho, F.A., et al., *Crohn's disease-associated Escherichia coli LF82 aggravates colitis in injured mouse colon via signaling by flagellin*. Inflamm Bowel Dis, 2008. **14**(8): p. 1051-60.
55. Barnich, N., et al., *CEACAM6 acts as a receptor for adherent-invasive E. coli, supporting ileal mucosa colonization in Crohn disease*. J Clin Invest, 2007. **117**(6): p. 1566-74.
56. Barnich, N. and A. Darfeuille-Michaud, *Role of bacteria in the etiopathogenesis of inflammatory bowel disease*. World J Gastroenterol, 2007. **13**(42): p. 5571-6.
57. Hollander, D., *Crohn's disease--a permeability disorder of the tight junction?* Gut, 1988. **29**(12): p. 1621-4.
58. Nenci, A., et al., *Epithelial NEMO links innate immunity to chronic intestinal inflammation*. Nature, 2007. **446**(7135): p. 557-61.
59. Strober, W., I. Fuss, and P. Mannon, *The fundamental basis of inflammatory bowel disease*. J Clin Invest, 2007. **117**(3): p. 514-21.
60. Clavel, T. and D. Haller, *Bacteria- and host-derived mechanisms to control intestinal epithelial cell homeostasis: implications for chronic inflammation*. Inflamm Bowel Dis, 2007. **13**(9): p. 1153-64.
61. Guarner, F. and J.R. Malagelada, *Gut flora in health and disease*. Lancet, 2003. **361**(9356): p. 512-9.
62. Bogaert, S., et al., *Differential mucosal expression of Th17-related genes between the inflamed colon and ileum of patients with inflammatory bowel disease*. BMC Immunol, 2010. **11**: p. 61.
63. Basso, P.J., et al., *Association among genetic predisposition, gut microbiota, and host immune response in the etiopathogenesis of inflammatory bowel disease*. Braz J Med Biol Res, 2014. **47**(9): p. 727-37.
64. Shadnouch, M., et al., *Effects of Probiotics on Gut Microbiota in Patients with Inflammatory Bowel Disease: A Double-blind, Placebo-controlled Clinical Trial*. Korean J Gastroenterol, 2015. **65**(4): p. 215-21.

65. Orel, R. and T. Kamhi Trop, *Intestinal microbiota, probiotics and prebiotics in inflammatory bowel disease*. World J Gastroenterol, 2014. **20**(33): p. 11505-24.
66. Quah, S.H., *Role of probiotics and nutrition in the management of chronic inflammatory bowel disease in children*. Singapore Med J, 2013. **54**(4): p. 183-4.
67. Shteyer, E. and M. Wilschanski, *Novel therapeutic modalities in pediatric inflammatory bowel disease*. Isr Med Assoc J, 2008. **10**(11): p. 816-20.
68. Rousseaux, C., et al., *Lactobacillus acidophilus modulates intestinal pain and induces opioid and cannabinoid receptors*. Nat Med, 2007. **13**(1): p. 35-7.
69. Giorgetti, G., et al., *Interactions between Innate Immunity, Microbiota, and Probiotics*. J Immunol Res, 2015. **2015**: p. 501361.
70. Yan, F., et al., *Soluble proteins produced by probiotic bacteria regulate intestinal epithelial cell survival and growth*. Gastroenterology, 2007. **132**(2): p. 562-75.
71. McCarthy, J., et al., *Double blind, placebo controlled trial of two probiotic strains in interleukin 10 knockout mice and mechanistic link with cytokine balance*. Gut, 2003. **52**(7): p. 975-80.
72. Fujii, T., et al., *Bifidobacterium breve enhances transforming growth factor beta1 signaling by regulating Smad7 expression in preterm infants*. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2006. **43**(1): p. 83-8.
73. Riedel, C.U., et al., *Anti-inflammatory effects of bifidobacteria by inhibition of LPS-induced NF-kappaB activation*. World J Gastroenterol, 2006. **12**(23): p. 3729-35.
74. O'Hara, A.M., et al., *Functional modulation of human intestinal epithelial cell responses by Bifidobacterium infantis and Lactobacillus salivarius*. Immunology, 2006. **118**(2): p. 202-15.
75. Schultz, M., et al., *Lactobacillus plantarum 299V in the treatment and prevention of spontaneous colitis in interleukin-10-deficient mice*. Inflamm Bowel Dis, 2002. **8**(2): p. 71-80.
76. Madsen, K.L., et al., *Antibiotic therapy attenuates colitis in interleukin 10 gene-deficient mice*. Gastroenterology, 2000. **118**(6): p. 1094-105.
77. Sougioultzis, S., et al., *Saccharomyces boulardii produces a soluble anti-inflammatory factor that inhibits NF-kappaB-mediated IL-8 gene expression*. Biochem Biophys Res Commun, 2006. **343**(1): p. 69-76.
78. Tursi, A., et al., *Low-dose balsalazide plus a high-potency probiotic preparation is more effective than balsalazide alone or mesalazine in the treatment of acute mild-to-moderate ulcerative colitis*. Med Sci Monit, 2004. **10**(11): p. PI126-31.
79. Bibiloni, R., et al., *VSL#3 probiotic-mixture induces remission in patients with active ulcerative colitis*. Am J Gastroenterol, 2005. **100**(7): p. 1539-46.
80. Huynh, H.Q., et al., *Probiotic preparation VSL#3 induces remission in children with mild to moderate acute ulcerative colitis: a pilot study*. Inflamm Bowel Dis, 2009. **15**(5): p. 760-8.
81. Sood, A., et al., *The probiotic preparation, VSL#3 induces remission in patients with mild-to-moderately active ulcerative colitis*. Clin Gastroenterol Hepatol, 2009. **7**(11): p. 1202-9, 1209 e1.
82. Miele, E., et al., *Effect of a probiotic preparation (VSL#3) on induction and maintenance of remission in children with ulcerative colitis*. Am J Gastroenterol, 2009. **104**(2): p. 437-43.
83. Tursi, A., et al., *Treatment of relapsing mild-to-moderate ulcerative colitis with the probiotic VSL#3 as adjunctive to a standard pharmaceutical treatment: a double-blind, randomized, placebo-controlled study*. Am J Gastroenterol, 2010. **105**(10): p. 2218-27.
84. Kato, K., et al., *Randomized placebo-controlled trial assessing the effect of bifidobacteria-fermented milk on active ulcerative colitis*. Aliment Pharmacol Ther, 2004. **20**(10): p. 1133-41.

85. Ishikawa, H., et al., *Randomized controlled trial of the effect of bifidobacteria-fermented milk on ulcerative colitis*. J Am Coll Nutr, 2003. **22**(1): p. 56-63.
86. Rembacken, B.J., et al., *Non-pathogenic Escherichia coli versus mesalazine for the treatment of ulcerative colitis: a randomised trial*. Lancet, 1999. **354**(9179): p. 635-9.
87. Henker, J., et al., *Probiotic Escherichia coli Nissle 1917 (EcN) for successful remission maintenance of ulcerative colitis in children and adolescents: an open-label pilot study*. Z Gastroenterol, 2008. **46**(9): p. 874-5.
88. Oliva, S., et al., *Randomised clinical trial: the effectiveness of Lactobacillus reuteri ATCC 55730 rectal enema in children with active distal ulcerative colitis*. Aliment Pharmacol Ther, 2012. **35**(3): p. 327-34.
89. Guslandi, M., P. Giollo, and P.A. Testoni, *A pilot trial of Saccharomyces boulardii in ulcerative colitis*. Eur J Gastroenterol Hepatol, 2003. **15**(6): p. 697-8.
90. Tsuda, Y., et al., *Clinical effectiveness of probiotics therapy (BIO-THREE) in patients with ulcerative colitis refractory to conventional therapy*. Scand J Gastroenterol, 2007. **42**(11): p. 1306-11.
91. Kruis, W., et al., *Maintaining remission of ulcerative colitis with the probiotic Escherichia coli Nissle 1917 is as effective as with standard mesalazine*. Gut, 2004. **53**(11): p. 1617-23.
92. Kruis, W., et al., *Double-blind comparison of an oral Escherichia coli preparation and mesalazine in maintaining remission of ulcerative colitis*. Aliment Pharmacol Ther, 1997. **11**(5): p. 853-8.
93. Zocco, M.A., et al., *Efficacy of Lactobacillus GG in maintaining remission of ulcerative colitis*. Aliment Pharmacol Ther, 2006. **23**(11): p. 1567-74.
94. Venturi, A., et al., *Impact on the composition of the faecal flora by a new probiotic preparation: preliminary data on maintenance treatment of patients with ulcerative colitis*. Aliment Pharmacol Ther, 1999. **13**(8): p. 1103-8.
95. Cui, H.H., et al., *Effects of probiotic on intestinal mucosa of patients with ulcerative colitis*. World J Gastroenterol, 2004. **10**(10): p. 1521-5.
96. Wildt, S., et al., *A randomised double-blind placebo-controlled trial with Lactobacillus acidophilus La-5 and Bifidobacterium animalis subsp. lactis BB-12 for maintenance of remission in ulcerative colitis*. J Crohns Colitis, 2011. **5**(2): p. 115-21.
97. Mylonaki, M., et al., *Molecular characterization of rectal mucosa-associated bacterial flora in inflammatory bowel disease*. Inflamm Bowel Dis, 2005. **11**(5): p. 481-7.
98. Mack, D.R., et al., *Extracellular MUC3 mucin secretion follows adherence of Lactobacillus strains to intestinal epithelial cells in vitro*. Gut, 2003. **52**(6): p. 827-33.
99. Gionchetti, P., et al., *High-dose probiotics for the treatment of active pouchitis*. Dis Colon Rectum, 2007. **50**(12): p. 2075-82; discussion 2082-4.
100. Gionchetti, P., et al., *Oral bacteriotherapy as maintenance treatment in patients with chronic pouchitis: a double-blind, placebo-controlled trial*. Gastroenterology, 2000. **119**(2): p. 305-9.
101. Gionchetti, P., et al., *Prophylaxis of pouchitis onset with probiotic therapy: a double-blind, placebo-controlled trial*. Gastroenterology, 2003. **124**(5): p. 1202-9.
102. Mimura, T., et al., *Once daily high dose probiotic therapy (VSL#3) for maintaining remission in recurrent or refractory pouchitis*. Gut, 2004. **53**(1): p. 108-14.
103. Pronio, A., et al., *Probiotic administration in patients with ileal pouch-anal anastomosis for ulcerative colitis is associated with expansion of mucosal regulatory cells*. Inflamm Bowel Dis, 2008. **14**(5): p. 662-8.
104. Shen, B., et al., *Maintenance therapy with a probiotic in antibiotic-dependent pouchitis: experience in clinical practice*. Aliment Pharmacol Ther, 2005. **22**(8): p. 721-8.
105. Pardi, D.S., et al., *Clinical guidelines for the management of pouchitis*. Inflamm Bowel Dis, 2009. **15**(9): p. 1424-31.

106. Kuisma, J., et al., *Effect of Lactobacillus rhamnosus GG on ileal pouch inflammation and microbial flora*. Aliment Pharmacol Ther, 2003. **17**(4): p. 509-15.
107. Gosselink, M.P., et al., *Delay of the first onset of pouchitis by oral intake of the probiotic strain Lactobacillus rhamnosus GG*. Dis Colon Rectum, 2004. **47**(6): p. 876-84.
108. Holubar, S.D., et al., *Treatment and prevention of pouchitis after ileal pouch-anal anastomosis for chronic ulcerative colitis*. Cochrane Database Syst Rev, 2010(6): p. CD001176.
109. Gupta, P., et al., *Is lactobacillus GG helpful in children with Crohn's disease? Results of a preliminary, open-label study*. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2000. **31**(4): p. 453-7.
110. Schultz, M., et al., *Lactobacillus GG in inducing and maintaining remission of Crohn's disease*. BMC Gastroenterol, 2004. **4**: p. 5.
111. Guslandi, M., et al., *Saccharomyces boulardii in maintenance treatment of Crohn's disease*. Dig Dis Sci, 2000. **45**(7): p. 1462-4.
112. Bousvaros, A., et al., *A randomized, double-blind trial of Lactobacillus GG versus placebo in addition to standard maintenance therapy for children with Crohn's disease*. Inflamm Bowel Dis, 2005. **11**(9): p. 833-9.
113. Prantera, C., et al., *Ineffectiveness of probiotics in preventing recurrence after curative resection for Crohn's disease: a randomised controlled trial with Lactobacillus GG*. Gut, 2002. **51**(3): p. 405-9.
114. Marteau, P., et al., *Ineffectiveness of Lactobacillus johnsonii LA1 for prophylaxis of postoperative recurrence in Crohn's disease: a randomised, double blind, placebo controlled GETAID trial*. Gut, 2006. **55**(6): p. 842-7.
115. Van Gossum, A., et al., *Multicenter randomized-controlled clinical trial of probiotics (Lactobacillus johnsonii, LA1) on early endoscopic recurrence of Crohn's disease after ileo-caecal resection*. Inflamm Bowel Dis, 2007. **13**(2): p. 135-42.
116. Hallert, C., M. Kaldma, and B.G. Petersson, *Ispaghula husk may relieve gastrointestinal symptoms in ulcerative colitis in remission*. Scand J Gastroenterol, 1991. **26**(7): p. 747-50.
117. Fernandez-Banares, F., et al., *Randomized clinical trial of Plantago ovata seeds (dietary fiber) as compared with mesalamine in maintaining remission in ulcerative colitis. Spanish Group for the Study of Crohn's Disease and Ulcerative Colitis (GETECCU)*. Am J Gastroenterol, 1999. **94**(2): p. 427-33.
118. Casellas, F., et al., *Oral oligofructose-enriched inulin supplementation in acute ulcerative colitis is well tolerated and associated with lowered faecal calprotectin*. Aliment Pharmacol Ther, 2007. **25**(9): p. 1061-7.
119. Kanauchi, O., et al., *Treatment of ulcerative colitis patients by long-term administration of germinated barley foodstuff: multi-center open trial*. Int J Mol Med, 2003. **12**(5): p. 701-4.
120. Hanai, H., et al., *Germinated barley foodstuff prolongs remission in patients with ulcerative colitis*. Int J Mol Med, 2004. **13**(5): p. 643-7.
121. Lindsay, J.O., et al., *Clinical, microbiological, and immunological effects of fructo-oligosaccharide in patients with Crohn's disease*. Gut, 2006. **55**(3): p. 348-55.
122. Benjamin, J.L., et al., *Randomised, double-blind, placebo-controlled trial of fructo-oligosaccharides in active Crohn's disease*. Gut, 2011. **60**(7): p. 923-9.
123. Hafer, A., et al., *Effect of oral lactulose on clinical and immunohistochemical parameters in patients with inflammatory bowel disease: a pilot study*. BMC Gastroenterol, 2007. **7**: p. 36.
124. Furrie, E., et al., *Synbiotic therapy (Bifidobacterium longum/Synergy 1) initiates resolution of inflammation in patients with active ulcerative colitis: a randomised controlled pilot trial*. Gut, 2005. **54**(2): p. 242-9.

125. Ishikawa, H., et al., *Beneficial effects of probiotic bifidobacterium and galacto-oligosaccharide in patients with ulcerative colitis: a randomized controlled study*. Digestion, 2011. **84**(2): p. 128-33.
126. Steed, H., et al., *Clinical trial: the microbiological and immunological effects of synbiotic consumption - a randomized double-blind placebo-controlled study in active Crohn's disease*. Aliment Pharmacol Ther, 2010. **32**(7): p. 872-83.
127. Fujimori, S., et al., *High dose probiotic and prebiotic cotherapy for remission induction of active Crohn's disease*. J Gastroenterol Hepatol, 2007. **22**(8): p. 1199-204.
128. Xavier, R.J. and D.K. Podolsky, *Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease*. Nature, 2007. **448**(7152): p. 427-34.
129. Cho, J.H., *The genetics and immunopathogenesis of inflammatory bowel disease*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(6): p. 458-66.
130. West, C.E., et al., *The gut microbiota and inflammatory noncommunicable diseases: associations and potentials for gut microbiota therapies*. J Allergy Clin Immunol, 2015. **135**(1): p. 3-13; quiz 14.
131. Jostins, L., et al., *Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease*. Nature, 2012. **491**(7422): p. 119-24.
132. Hermiston, M.L. and J.I. Gordon, *Inflammatory bowel disease and adenomas in mice expressing a dominant negative N-cadherin*. Science, 1995. **270**(5239): p. 1203-7.
133. Contractor, N.V., et al., *Lymphoid hyperplasia, autoimmunity, and compromised intestinal intraepithelial lymphocyte development in colitis-free gnotobiotic IL-2-deficient mice*. J Immunol, 1998. **160**(1): p. 385-94.
134. Gosiewski, T., et al., *Horizontal distribution of the fecal microbiota in adolescents with inflammatory bowel disease*. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2012. **54**(1): p. 20-7.
135. Prescott, S.L. and B. Bjorksten, *Probiotics for the prevention or treatment of allergic diseases*. J Allergy Clin Immunol, 2007. **120**(2): p. 255-62.
136. Jijon, H., et al., *DNA from probiotic bacteria modulates murine and human epithelial and immune function*. Gastroenterology, 2004. **126**(5): p. 1358-73.
137. Yan, F. and D.B. Polk, *Probiotic bacterium prevents cytokine-induced apoptosis in intestinal epithelial cells*. J Biol Chem, 2002. **277**(52): p. 50959-65.
138. Rachmilewitz, D., et al., *Toll-like receptor 9 signaling mediates the anti-inflammatory effects of probiotics in murine experimental colitis*. Gastroenterology, 2004. **126**(2): p. 520-8.
139. Doherty, G.A., et al., *Meta-analysis: targeting the intestinal microbiota in prophylaxis for post-operative Crohn's disease*. Aliment Pharmacol Ther, 2010. **31**(8): p. 802-9.